原生質融合之體細胞雜交在果樹育種上之應用

Application of Somatic Hybridization via Protoplast Fussion in Fruit Tree Breeding

林 榮 貴
Lin Rong－Quey

鳳山熱帶園藝試驗分所

一、前 言

果樹的雜交育種，經常由於雜交不親合性或不稔性，無法獲得雜交種子或種子數極少，使得雜交時親本組合的選擇受到相當的限制。此外，多胚性亦普遍存在於柑桔類、芒果等果樹中，若以多胚性品種做爲雜交的母本，因珠心胚數較多，受精胚祇有一個，在多寡懸殊下，而珠心胚的發育通常較受精胚爲快，受精胚容易在發育中途夭折，致使獲得雜交實生苗的機率大爲降低。爲了解決多胚性在柑桔雜交育種上所造成的困擾，過去雜交時都以枳殼做母本，在幼苗期依照枳殼三出葉的特徵，辨別出雜交實生苗珠心胚苗;而後更有利用葉片精油成分的分析，早期選拔雜交實生苗。近年來，同功異構酶電泳分析在作物遺傳解析及品種鑑定的應用頗爲普遍，目前已知柑桔、柿、蘋果、芒果等果樹的品種，均可利用同功異構酶電泳法鑑定之；同功異構酶也可應用在柑桔雜交實生苗的辨別上。此外，也有利用 r 線照射或高溫處理，抑制柑桔珠心胚的形成，或將雜交後的幼胚取出進行胚培養，或者雜交時以胚數較少的品種做母本，提高育種的效率。

過去作物品種的改良大都以雜交育種爲主，重複雜交的結果，優良形質的遺傳基因已被組合利用殆盡。傳統的雜交育種目前已經達到瓶頸階段，今後若欲提高產量與品質，必須在毒素病的抵抗性及對氣候環境等逆境的忍受力等難題上有所突破。非常遺憾的是大多數作物的栽培品種缺乏抗或耐毒素病、及耐寒性等遺傳基因，該等基因大都存在於遠緣屬、種或其他科植物中而傳統

的雜交育種技術無法將抗毒素病或抗寒等遺傳基因從遠緣種、屬或其他科植物導入。

近年來生物技術的研究甚囂塵上，細胞融合技術的開發，不斷地育出體細胞雜種，不僅可以將某些作物的抗毒素病基因及其他生理上重要的基因如：控制番茄後熟的基因，導入目前的栽培品種中，同時也可以創造出前所未有的植物。目前爲止，細胞融合育種的研究以茄科作物最多，煙草及馬鈴薯的抗病（捲葉毒素病、疫病、軟腐病、青枯病）育種，已有相當大的進展。十字花科中紅甘藍與大白菜的屬間雜交種一白藍菜，即爲體細胞雜種的成功實例之一。果樹（特別是多年生木本果樹）體細胞雜種的研究僅柑桔類較多，1985年日本發表育成甜橙與枳殼的體細胞雜種，爲世界首次果樹體細胞雜種的成功實例，雖然其實用價值仍有待評估，但至少在技術上已突破傳統雜交育種的瓶頸，帶給果樹育種工作者些許的希望與信心，以下僅將其育成經過做一概述性的介紹。

二、原生質體（Protoplast）的培養

欲藉細胞融合做出體細胞雜種，必須先確立(1)由植物體單離出健全的原生質體，(2)由原生質體再形成植物體等兩種技術。多胚性的柑桔類容易從珠心組織誘導出具有擬胚再分化能力的癒合組織（embryogenic calli）。從大多數柑桔類的花或幼果中取出胚珠，將其培養在 MT 培養基（含0.15M 蔗糖及0.8% 洋菜），在25℃、2,000lux、16小時light／8小時dark條件下，珠心胚的原始細胞（original cell)開始分裂，2～3個月後即可形成擬胚，亦即引起體細胞的不定胚分化；若將取出的胚珠培養在MTB 培養基（MT培養基加入10mg／l的 6-benzylaminopurine)中，在同樣光照溫度條件下，可誘導出白色粒狀的珠心癒合組織（nucellar callus)，此種珠心癒合組織能夠在液體MTB 培養基中繼代培養，若將珠心癒合組織移植到MT培養基或將MT培養基的蔗糖更換爲半乳糖（galactose)及甘油(glycerol)而成的培養基中培養，就可形成擬胚；總之，珠心癒合組織不管在本身癒合組織的維持和擬胚分化的控制上均極容易。

從珠心癒合組織容易單離出健全的原生質體，單離原生質體的培養也極容易，祇要在低細胞密度（1～4×10,000個／ml）、低滲透壓（0.2～0.4 M）下培養，幾乎均可直接發育成擬胚；如果將細胞密度提高到 100,000個／ml，及甘露糖醇（mannitol）的濃度提高到0.4M以上的高滲透壓下，則單離的原生質體無法發育成擬胚，僅形成白色不定形的細胞團塊（colony）；原生質體所形成的擬胚經二次不同配方的MT洋菜培養基培養，即可再生成爲完全的植物體。該植物體的葉、花及果實等形態均正常，其染色體的數目、葉片的精油成分及種酵素同功異構酶的條帶(band)均與原來植物無異。

目前爲止，柑桔類中除甜橙外，酸橙、溫州蜜柑、椪柑、葡萄柚、檸檬、粗檸檬、及其他種間雜交種等均可以從原生質體再生出完全的植物體。

由於柑桔原生質體培養的研究甚多，能夠輕而易舉地從原生質體再生出毫無變異的正常植物體，所以柑桔類在細胞融合育種上的發展較其他果樹爲快。

三、"Trovita" 甜橙（Citrus sinensis Osb.）與枳殼（Poncirus trifoliata Raf.）的體細胞雜種育成

日本農水省果樹試驗場安芸津支場與龜甲萬公司共同研究，1985年育成"Trovita" 甜橙與枳殼的屬間體細胞雜種，爲果樹及木本性作物的細胞融合開創世界先例。細胞融合的步驟概要如圖一所示，首先，從甜橙的花中取出胚珠組織，培養出珠心癒合組織後，再以酵素溶液（pH 5.7，內含 0.3% Macerozyme R-10、0.3% Cellulase Onozuka R-10、 0.1% Driselase、1/2 strength of MT macro elements及0.7 M manntiol)單離出原生質體，另取枳殼實生苗的葉肉細胞以酵素溶液（pH 5.8,內含0.3% Macerozyme R-10、 0.3% Cellulase Onozuka R-10)單離出原生質體，將兩種原生質體的懸浮液(細胞密度爲 1,000,000 個／ml)各取等量混合之，加入PEG（polyethylene glycol 6000）溶液（以0.6 M mannitol-50 mM $CaCl_2$ 稀釋)，使兩者融合，10分鐘後，以150×g. 5 min.離心分離，取離心處理後的原生質體，在高細胞密度(100,000個／ml）、不含植物荷爾蒙但含高濃度糖（0.6 M 蔗糖）的MT培養基中培養，2－3個月後會形成白色的不定形細胞團塊和綠色的擬胚。

細胞融合最重要的工作是如何選拔雜種細胞或將來會產生雜種細胞的癒合組織。首先可以利用原生質體的顏色來辨別異質融合體（heterokaryocytes）與同質融合體（ homokaryocytes ），"Trovita" 甜橙的單離原生質體或彼此相互融合的原生質體均爲無色，枳殼的單離原生質體或枳殼與枳殼互相融合的原生質體均爲綠色，可以從顏色上看到"Trovita" 甜橙與枳殼原生質體的融合過程；另外，也可以藉著培養基的蔗糖濃度篩選出異質融合體，上段『原生質體的培養』中已述及：柑桔珠心癒合組織所培養出的原生質體，在低細胞密度、低滲透壓下培養，可直接發育成擬胚，但在高細胞密度、高滲透壓下培養，祇會形成白色的不定形細胞團塊，因此"Trovita甜橙與枳殼的原生質體經融合處理後，在相對高細胞密度（100,000個／ml)、高蔗糖濃度（高滲透壓）培養基中培養時，所形成的白色不定形細胞團塊應爲甜橙的的原生質體，而枳殼的原生質體無法繼續分裂而致死，祇有兩種原生質體融合的個體才能發育成擬胚，由顏色與培養基的蔗糖濃度可判定所成的擬胚爲甜橙與枳殼的雜種擬胚。

將此擬胚移到含500mg／l麥芽抽出物、40mg／l adenine及1 mg／l kinetin的MT洋菜培養基中，培養1～2個月後形成子葉狀擬胚（cotyledonary embryoids），再移到含1 mg／l gibberellic acid的 MT洋菜培養基中培養，經1～4個月即可再生出的完全的植物體，此植物體在葉片形態上與枳殼同爲三出葉，但葉片的大小、厚度、光滑與"Torvita" 甜橙相近；檢查其根尖細胞的染色體數爲36，恰爲"Trovita" 甜橙（2n＝18）與枳殼（2n＝18）的總和；而葉片形態亦介於兩者之間，因此可斷定此種體細胞雜種爲複二元體(amphidiploid）。

爲了更進一步確認其雜種性，曾經進行rRNA遺傳基因分析，及過氧化酵素同功異構酶電泳分析，發現再生植物體具有兩親所特有的條帶，因此更可確認其爲體細胞雜種。

四、華盛頓臍橙與葡萄柚、溫州蜜柑、"murcott" tangor的體細胞雜種之育成

依照"Trovita" 甜橙與枳殼的體細胞雜種之模式，安芸津支場於1988年後又陸續育成華盛頓臍橙與葡萄柚、溫州蜜柑、"Murcott" tangor (Citrus sinensis × C. tangerina的雜交種)的體細胞雜種。其方法：取華盛頓臍橙之花的胚珠組織，培養出珠心癒合組織，再單離出原生質體；另取葡萄柚、溫州蜜柑、"Murcott" tangor實生苗的葉肉細胞單離出原生質體，兩種原生質體均以100,000 個／ml的密度混合在一起，加入PEG 使之融合後，培養在含有0.6 M sucrose和0.6 %agarose 的MT洋菜培養基中，葡萄柚、溫州蜜柑、"Murcott" tangor的原生質體幾乎都不分裂而死亡，華盛頓臍橙的原生質體僅形成白色不定形的細胞團塊，祇有兩種原生質體融合的個體才能發育成綠色擬胚(green embryoids)，將此綠色擬胚移至含有 500mg／l maltose、 40mg／l adenine、0.8% agar 的MT洋菜培養基中，經一個月後即可發育成子葉狀擬胚，再將此子葉狀擬胚移至含有1mg／l GA 的MT洋菜培養基中，經六個月即可發育成完全植株。檢查其根尖細胞的染色體數爲36，恰爲兩親本（2n＝18）之和，判斷其爲複二倍體的體細胞雜種。再以rRNA遺傳基因分析，及過氧化酵素同功異構酶電泳分析，均發現此植株具有兩親本特有之條帶，因而更可確認爲體細胞雜種。

五、細胞融合在果樹育種上之利用與展望

如上所述，經由原生質體融合已經成功地育成柑桔的種間及屬間體細胞雜種，解決了多胚性與不稔性在柑桔雜交育種上的困擾。目前爲止已經育出的體細胞雜種如表 1 所示，體細胞雜種從染色體數（＝36）及rRNA分析、過氧化酵素同功異構酶分析均證實爲複二倍體，理論上應具有稔性，事實上日本果樹試驗場安芸律支場1985年育成"Trovita" 甜橙與枳殼的體細胞雜種，已經開花結果如照片一所示，其花粉稔性甚高。

在利用上，育成的體細胞雜種直接用在經濟栽培的可能性似乎不太高，因爲體細胞融合後染色體數加倍而成的四倍體（複二倍體），果皮較厚，果汁少，食用價值低。

若欲育成實用化的品種，其方法有下列幾種：

1.可利用花藥培養使體細胞雜種回復成二倍體，或單離出單倍體的原生質體使其彼此融合而成二倍體的體細胞雜種。

2.使四倍體的體細胞雜種與二倍體的栽培品種雜交，育成三倍體品種，或使單倍體配偶子的原生質體與體細胞（二倍體）的原生質體進行融合，育成三倍體的體細胞雜種。

一般而言，柑桔類的三倍體植株生長勢强、產量高、殆無種子。過去大多從多胚性的珠心胚實生苗或組織培養苗的偶發突變中選獲四倍體，或以秋水仙精處理誘變獲得四倍體，再將四倍體與二倍體雜交獲得三倍體，但此二方法獲得三倍體的機率均極小且費時，若能使單倍體配偶子與二倍體體細胞進行原生質體融合育成三倍體的體細胞雜種，則可縮短育種所需的時間並提高獲得

三倍體的機率，如果性狀遺傳基因的顯隱性關係清楚時，性狀的導入與維持較能掌握。

在砧木的利用上，由於體細胞雜種的染色體未經減數分裂，遺傳基因未經分離與重新組合，直接加倍而成複二倍體，對於顯性或共顯性基因控制的性狀表現上會有互補的作用；柑桔類顯性基因控制的性狀有：耐寒性、多胚性、抗根腐病、抗tristeza毒素病、抗柑桔線蟲等。另外，矮性砧木的性狀也可經體細胞雜種遺傳給後代。

在遺傳基因庫的導入與保存上，柑桔屬間或種間雜交欲由近緣屬種導入抗病性及抗逆境（生物性與非生物性）的基因，經常因雜交不親合性與嫁接不親合性而受阻，可經體細胞雜種導入該基因利用之，並解決嫁接不親合性等問題。

今後會陸續育出更多的體細胞雜種，其實用價值雖尚待進一步評估，但至少可供今後柑桔雜交育種的材料。總之，與其期望利用體細胞融合技術直接育成可供實際栽培的新品種，倒不如將它當做創造育種材料的手段，來得實際些。

果樹的雜交育種，除了如柑桔類、芒果等受多胚性及不稔性的困擾外，育種所需年數長、面積大、人力多，且許多性狀之遺傳基因複雜，遺傳組成多爲異質接合，育種效率低。若爲了突破傳統雜交育種的障礙，提高育種效率，其他木本果樹欲仿照柑桔類的模式，利用細胞融合育出體細胞雜種，必需先解決：①由植物組織→癒合組織→單離出原生質體，②由原生質體再生出完全無異的植株，③細胞融合，④選拔融合原生質體或擬胚等技術。在此方面尚有許多技術上的問題，有待今後有興趣的研究人員的參與及努力。

表1. 柑桔類的體細胞雜種之親本組合、染色體數育成

珠心細胞	葉肉細胞	染色體數	育成發表者及年代
"Trovita"甜橙	枳殼	36	小林省藏等 1985
"Trovita"甜橙	"Troyer" citrange	36	小林省藏等、ohgawara 1988
"Trovita"甜橙	"林"溫州密柑	36	小林省藏等、ohgawara 1988
"Bahia"臍橙	"Troyer" citrange	36	小林省藏等 1988
"Bahia"臍橙	"Mash"葡萄柚	36	小林省藏等 1988
"Washington"臍橙	"林"溫州密柑	36	小林省藏等 1988
"Washington"臍橙	"Murcott"tangor	36	小林省藏等、ohgawara 1988
"Hamlin"甜橙	"飛龍"枳殼	36	Grosser et al. 1988
"Hamlin"甜橙	Severinia disticha	36	Grosser et al. 1988
"key"檸檬	"Valencia"甜橙	36	Grosser et al. 1988
"Hamlin"甜橙	Citropsis gilletiana	36	Grosser & Gmitter 1990
"Cleopatra"蜜柑	C. gilletiana	36	Grosser 未發表

六、參考文獻：

1. 小林省藏 1989 カンキツ類の細胞融合 柑橘研究 (STUDIA CITROLOGICA) 15:51～ 56.

2. Grosser, J. W.;Gmitter, F. G. 1990 Protoplast fussion and citrus improvement. Plant breeding reviews vol.6 p.339～ 374.

3. Kobayashi, S. 1987 Citrus protoplast technology: protoplast culture and somatic cell fasion. FFTC books series No.35 The breeding of horticultural crops. p.123～ 135.

4. Kobayashi, S.; Fujiwara, K.;Oiyama, 1.; Ohgawara, T.; Ishii, S. 1988 Somatic hybridization between Navel orange and "Murcott" tangor. Proceedings of the Sixth International Citrus Congress. p.135～ 140.

討　論

許圳塗：細胞融合在剛開始的時候，大部份是應用在細胞質遺傳方面的探討，平常很少有機會使兩方面的細胞質能夠擺在同一細胞裏，所以細胞融合可跨越親緣性限制，提供瞭解雙方細胞質基因交互作用及傳遞模式，進而供有利細胞質基因轉移應用，及建立不同同性質倍數組合。另外一方式把一方親本的核不活性化或破壞掉，可以做到細胞質的轉移，倍体數不會改變。細胞融合沒有有性生殖障礙問題，及跨越親緣性限制，但在育種上仍需很多操作及稔性問題解決，不過有一方向，特別是在砧木育種甚具潛力，融合代生長勢弱或結實性不好，砧木利用仍可以考慮，因爲砧木只要利用它的抗耐性、矮化的特性。

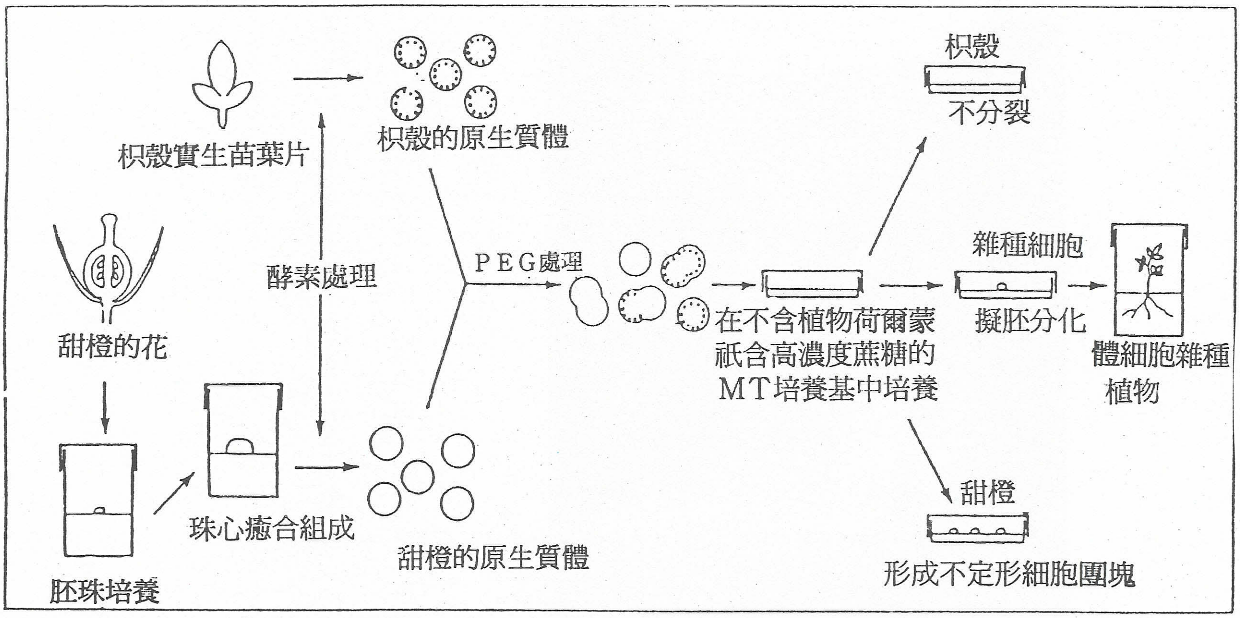
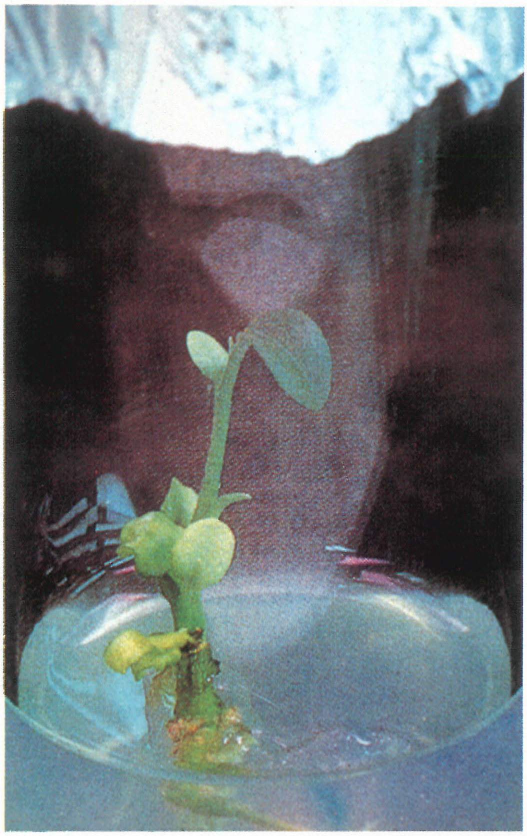


圖1. "Trovita"甜橙與枳殼體細胞雜種育成概要

照片一：甜橙與枳殼體細胞雜種(中間葉片較小者)開花情形



照片二：温洲蜜柑與臍橙的體細胞雜種試管內之幼植株

照片三：温洲蜜柑與臍橙之體細胞雜種移出試管外之植株